

Nederlandsch Octrooibureau

AAAA 1888

Octrooien, Merken, Modellen
en Licenties

Patents, Trademarks, Design
and Licensing

Certified Netherlands translation of a European Patent (Art 65 EPC)

Patent number 0746608

Patentee Novozymes A/S

Application filed on 21 February 1995

Application number 95909664.5

Patent mentioned in
European Patent Bulletin 20 August 2003

Patent will expire on 21 February 2015

Annuities for maintaining
the patent will be due on 29 February

Filing date of certified
Netherlands translation 20 November 2003

Correspondentie / Correspondence
Postbus 29720 / P.O. Box 29720
502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague
The Netherlands
E-mail: info@octrooibureau.nl
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag
Scheveningseweg 82 2517 KZ Den Haag
Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28
Bureau Ede
Bennekomseweg 43, 6717 LL Ede
Tel: +31 (0)318 707 000 Fax: +31 (0)318 707 007

Her Nederlandsch Octrooibureau
is een maatschap die bestaat uit
beroepsvennootschappen. Iedere
aansprakelijkheid is beperkt tot het
bedrag dat in het desbetreffende geval
onder onze beroepsaansprakelijkheids-
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is
a partnership of professional
corporations. Any liability shall
be limited to the amount which
is paid out under the firm's
professional liability policy
in the matter concerned.

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0017242

16

Nederlandsch Octrooibureau

A 1888

Octrooigemachtigden
European Patent Attorneys

Merken- & Modellen-
gemachtigden
Trademark Design
Attorneys

VERKLARING

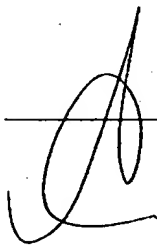
Ondergetekende,

Ir J.H.M. Coppens

ingeschreven in het Register van Octrooigemachtigden bedoeld in Artikel 3 van het Octrooigemachtigdenreglement betreffende het optreden als gemachtigde voor het Bureau voor de Industriële Eigendom, verklaart hierbij dat de aangehechte vertaling naar zijn beste weten een volledige en getrouwe vertaling is van de tekst van het Europese octrooischrift nr. 0746608 (B1).

's-Gravenhage

20 november 2003



Correspondentie / Correspondence
Postbus 29720 / P.O. Box 29720

2 LS Den Haag / 2502 LS The Hague
The Netherlands

E-mail: info@octrooibureau.nl
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag

Scheveningsweg 82 2517 KZ Den Haag

Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28

Bureau Wageningen

Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen

Tel: +31 (0)317 479 790

Het Nederlandsch Octrooibureau is een maatschap die bestaat uit beroepsvennootschappen. Iedere aansprakelijkheid is beperkt tot het bedrag dat in het desbetreffende geval onder onze beroepsaansprakelijkheidsverzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is a partnership of professional corporations. Any liability shall be limited to the amount which is paid out under the firm's professional liability policy in the matter concerned.

NZAS-0017243

Werkwijze voor het vervaardigen van een geïmmobiliseerd enzympreparaat en toepassing van het geïmmobiliseerde enzympreparaat

Beschrijving

[0001] De uitvinding omvat een werkwijze voor het vervaardigen van een geïmmobiliseerd enzympreparaat omvattende een enzym dat kan worden toegepast voor een organische synthese in een in hoofdzaak organisch medium dat verstoken is van vrij water en een toepassing van het geïmmobiliseerd enzympreparaat. Het meest algemeen voorkomende enzym dat kan worden toegepast voor een organische synthese in een in hoofdzaak organisch medium dat verstoken is van vrij water is lipase. Voorbeelden van andere enzymen van deze soort zijn proteasen, amidasen, esterasen, oxidoreductasen en nitrilasen. In hetgeen hierna volgt wordt de uitvinding veelal beschreven met referte aan lipase als het belangrijkste voorbeeld van een enzym dat kan worden toegepast voor een organische synthese in een in hoofdzaak organisch medium dat verstoken is van vrij water. Het begrip 'organische synthese' heeft de in de organische chemie algemeen aanvaarde betekenis. Kenmerkende voorbeelden van organische syntheses die behoren tot de draagwijdte van de uitvinding zijn derhalve als volgt: herveresteringen, omesteringen, onderlinge veresteringen, acyleringen, epoxyderingen, aminolyses, ammoniolyses, oxidaties en reducties. Onder het begrip 'in hoofdzaak organisch medium dat verstoken is van vrij water' dient te worden verstaan een één-fasig medium waarvan het organische deel ten minste 50% w/w bedraagt.

[0002] Geïmmobiliseerde lipasepreparaten worden toegepast als katalysator voor onderlinge veresteringen en andere vet-gerelateerde processen, b.v. de vervaardiging van substituten voor cacaoboter. In geval van een ladingsgewijze reactie dient de katalysator te worden gescheiden van het reactiemengsel om na beëindiging van de reactie opnieuw te kunnen worden gebruikt. Voor een bevredigend resultaat is derhalve een goede filterbaarheid van de katalysator nodig.

[0003] In WO 90/05778 wordt een werkwijze beschreven voor het vervaardigen van een geïmmobiliseerd lipasepreparaat dat kan worden toegepast bij bijvoorbeeld de productie van margarine. Dit preparaat omvat een macroporeuze silicadrager.

[0004] In EP 140 542 wordt een geïmmobiliseerd lipasepreparaat beschreven voor het onderling veresteren van vetten. Dit preparaat omvat een anionenwisselharsdrager.

[0005] Deze beide geïmmobiliseerde lipasepreparaten uit de bestaande techniek hebben het nadeel dat ze duur zijn. Vooral met betrekking tot de productie van margarine, die wereldwijd vervaardigd wordt in hoeveelheden van miljoenen tonnen per jaar, is het van belang de productiekosten tot een minimum te beperken.

[0006] Het doel van de uitvinding is derhalve te voorzien in een werkwijze voor het vervaardigen van een goedkoop geïmmobiliseerd enzympreparaat dat technische eigenschappen dient te bezitten die gelijk of bijna gelijk zijn aan die van geïmmobiliseerde enzympreparaten volgens de bestaande techniek, vooral ten aanzien van de filterbaarheid na een voltooide ladingsgewijze productie van margarine, en ten aanzien van een lagedrukval in kolommen voor een continue bedrijfsvoering, voor het geval het enzym een lipase is, en in een toepassing van een zodanig geïmmobiliseerd enzympreparaat.

[0007] De werkwijze volgens de uitvinding voor het vervaardigen van een geïmmobiliseerd enzympreparaat omvattende een enzym dat kan worden toegepast voor een organische synthese in een in hoofdzaak organisch medium dat verstoken is van vrij water wordt gekenmerkt door het feit dat een vloeibare enzymsamenstelling en een uit deeltjes bestaande silicadrager met een deeltjesgrootte van minder dan ongeveer 100 μm worden toegepast als in een granulator of extruder in te voeren materialen, waarna een granulering of extrusie wordt uitgevoerd. De vloeibare enzymsamenstelling kan niet-waterig zijn, b.v. op basis van alcohol, of waterig. De uit deeltjes bestaande silicadrager kan een brede deeltjesgrootteverdeling vertonen, b.v. tussen ongeveer 5 μm en 100 μm . In deze beschrijving met conclusies dient onder 'silica' te worden verstaan óf silica óf een silicaat, b.v. magnesiumsilicaat. Men dient te bedenken dat de uitvinding zowel de situatie omvat waarin eerst een uit deeltjes bestaande geïmmobiliseerde lipasesamenstelling met een deeltjesgrootteverdeling die vergelijkbaar is met de deeltjesgrootteverdeling van de uit deeltjes bestaande silicadrager wordt vervaardigd, waarna de granulering of extrusie wordt uitgevoerd (zie Voorbeelden 6 en 7), als de situatie waarin de vervaardiging in slechts één stap wordt uitgevoerd (zie Voorbeelden

Ook dient men te bedenken dat het enzym tijdens het granuleren of extruderen als bindmiddel kan optreden en/of dat een specifiek bindmiddel kan worden toegevoegd, b.v. gelatine of polyvinylpyrrolidon. Tijdens de werkwijze volgens de uitvinding dient bij voorkeur een verstuiwing te worden uitgevoerd, veelal een verstuiwing van de voerbare enzymsamenstelling en/of een verstuiwing van het bindmiddel in voerbare vorm. Ook dient men te bedenken dat de bij de werkwijze volgens de uitvinding toegepaste inrichting voor de uitvinding niet van speciaal belang is omdat elk type granulator, b.v. een fluid-bedsproeier-granulator, of elk type extruder kan worden toegepast.

[0008] Een poedervormig geïmmobiliseerd lipasepreparaat op silicabasis wordt beschreven in b.v. WO 88/02775, pagina 11, regels 21 - 24. Dit geïmmobiliseerde lipasepreparaat is als gevolg van een slechte filtreerbaarheid na een ladingsgewijs proces en het ontstaan van een hogedrukverlies tijdens een in een kolom uitgevoerd continu proces volledig ongeschikt voor zowel ladingsgewijs als continu uitgevoerde vet-gerelateerde werkwijzen.

[0009] Geïmmobiliseerde lipasepreparaten worden beschreven in EP 579928 en in Appl. Microbiol. Biotechnol. (1988) 28: 527 - 530, maar geen van deze lipasepreparaten volgens de bestaande techniek omvatten een silicadrager.

[0010] In Chem. Abstract Vol. 118 (1993): 55095v wordt een geïmmobiliseerd lipasepreparaat op een silicadrager beschreven. Echter, de werkwijze volgens de uitvinding omvattende de deeltjesgrootte van de drager en de granulering of extrusie wordt niet beschreven.

[0011] Verrassenderwijs is gebleken dat het volgens de werkwijze volgens de uitvinding geïmmobiliseerde enzympreparaat op de eerste plaats dramatisch goedkoper is dan de vergelijkbare in de techniek reeds bestaande geïmmobiliseerde enzympreparaten en dat het op de tweede plaats technische eigenschappen laat zien die gelijk of bijna gelijk zijn aan de in de techniek reeds bestaande geïmmobiliseerde enzympreparaten, b.v. ten aanzien van de filtreerbaarheid na een ladingsgewijs vet-gerelateerd proces en het ontstaan van een lagedrukverlies tijdens een continu uitgevoerd vet-gerelateerd proces, wanneer het enzym een lipase is.

[0012] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat het enzym een lipase is.

[0013] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat de lipase in de vloeibare lipasesamenstelling een thermostabiele lipase is.

5 [0014] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat de lipase in de vloeibare lipasesamenstelling wordt voortgebracht door het kweken van een micro-organisme met een gen die codeert voor een lipase afgeleid van een stam van de *Humicola* species, *Candida antarctica* of *Rhizomucor miehei*, of deze tot expressie brengt.

10 [0015] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat de verhouding tussen de hoeveelheid vloeibare lipasesamenstelling en het gewicht van de uit deeltjes bestaande silicadrager ten minste 100.000 LU/g drager (drooggewicht) is. LU is de eenheid van de lipase-activiteit zoals beschreven in AF 95.1/2-GB, die op verzoek kan worden verkregen bij Novo Nordisk A/S. Bij de LU bepaling wordt tributyrine toegepast als substraat voor het bepalen van
15 de lipase-activiteit.

[0016] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat de zuiverheid van de silica ten minste 50 % bedraagt, bij voorkeur ten minste 75%.

20 [0017] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat een granulator wordt toegepast, bij voorkeur een snelmenger of een menger-granulator.

[0018] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat een vloeibare samenstelling van een bindmiddel, bij voorkeur gelatine of polyvinylpyrrolidon, tijdens het granuleren of extruderen door
25 verstuiwen in de granulator of extruder wordt ingebracht.

[0019] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt door het feit dat het granuleren of extruderen wordt uitgevoerd voor het vervaardigen van het geïmmobiliseerde lipasepreparaat met een verdeling van de deeltjesgrootte die overeenkomt met een hoeveelheid van ten minste 90% tussen 50 µm
30 en 2.000 µm.

[0020] Het met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding bereide geïmmobiliseerde enzympreparaat wordt toegepast voor het door het enzym gekatalyseerde proces.

- [0021] Het met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding bereide geïmmobiliseerde enzympreparaat wordt toegepast voor vet-gerelateerde processen. Men dient te bedenken dat deze vet-gerelateerde processen ladingsgewijs of continu kunnen worden uitgevoerd. Bij ladingsgewijze uitvoering is gebleken dat het met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding vervaardigde geïmmobiliseerde lipasepreparaat aan het einde van het enzymatische proces een bevredigende filterbaarheid vertoont, en bij continue uitvoering is gebleken dat het met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding vervaardigde geïmmobiliseerde lipasepreparaat een goede fysische sterkte vertoont die leidt tot een bevredigend resultaat van de kolom.
- 10 [0022] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de toepassing volgens de uitvinding bestaat uit de onderlinge verestering van vetten en wordt gekenmerkt door het feit dat vloeibare vetten of vetmengsels, waaronder vrije vetzuren of vetzure esters, in aanraking worden gebracht met het geïmmobiliseerde lipasepreparaat.
- [0023] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de toepassing volgens de uitvinding
15 bestaat uit de synthese van glyceriden of andere vetzuuresters en wordt gekenmerkt door het feit dat een mengsel van glycerol of gesubstitueerde glycerolen of andere typen alcoholen en vrije vetzuren in aanraking wordt gebracht met het geïmmobiliseerde lipasepreparaat.
- [0024] Een voorkeursuitvoeringsvorm van de toepassing volgens de uitvinding
20 bestaat uit de synthese van glycolipiden. De synthese van glycolipiden met geïmmobiliseerde lipasepreparaten in het algemeen wordt beschreven in Björkling, F., et al. (1989), J. Chem. Soc., Chem. Commun., pag. 934 - 935.
- [0025] De uitvinding zal aan de hand van de navolgende voorbeelden worden toegelicht.
- 25 [0026] Alle productievoorbeelden (1 - 8) geven de ladingsgewijze uitvoeringsvorm weer van de werkwijze volgens de uitvinding. Voor de vervaardiging op industriële schaal wordt gewoonlijk de voorkeur gegeven aan de continue uitvoeringsvorm. Voorbeeld 9 is een toepassingvoorbeeld.
- [0027] De toepassing volgens de uitvinding wordt indirect toegelicht in de
30 Voorbeelden 1 - 8 wanneer men bedenkt dat elke BAUN bepaling de toepassing (onderlinge verestering) volgens de uitvinding weergeeft. De toepassing volgens de uitvinding wordt direct weergegeven in Voorbeeld 9.

[0028] Fig. 1, direct betrekking hebbend op Voorbeeld 9, laat de omzetting zien met betrekking tot de synthese van een ester die wordt uitgevoerd in de vorm van een continue kolombewerking, afhankelijk van de tijd.

5 VOORBEELDEN

VOORBEELD 1

[0029] In een van een impeller met een toerental van 900 omw/min voorziene snel-
 10 menger werd 65 g poedervormig synthetisch magnesiumsilicaat, Celkate T-21
 (Manville), ingebracht. Op het silica-poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was,
 gedurende ongeveer vijf minuten continu 75 g vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipase-
 concentraat (bereid volgens het Deense octrooi nr. 157560 met *Humicola lanuginosa*
 DSM 3819, gehalte droge stof 30%, met een activiteit van 700.000 LU/ml) verstoven.
 15 Het gevormde granulaat werd tot de volgende ochtend bij kamertemperatuur gedroogd
 en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de analyse van
 het monster kwam uit op 2,6 BAUN/g. Met de bepaling van de lipase-activiteit uitge-
 drukt in BAUN (Batch Acidolysis Units Novo) wordt de aanvangssnelheid gemeten
 van de opname van decaanzuur in zonnebloemolie met een hoog oleaatgehalte (10%
 20 water, 70°C). Een uitvoerige beschrijving van de werkwijze (MP 9410704) is op ver-
 zoek verkrijgbaar bij Novo Nordisk A/S. De bepaling werd uitgevoerd zonder magne-
 tisch roeren, maar in een geschud waterbad.

VOORBEELD 2

25 [0030] In een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd 65 g Celkate T-
 21 ingebracht. Op het poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu 25 g
 vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1
 verstoven. Hierna werd op het poeder 50 g vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipasecon-
 30 centraat met 3% (w/w) Kollidon K25 polyvinylpyrrolidon (BASF) verstoven. Het ge-
 vormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd
 (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de analyse van het monster
 kwam uit op 0,5 BAUN/g.

VOORBEELD 3

[0031] In een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd 40 g poedervormig gecalcineerd diatomeeënaarde, Clarcel CBL 3 (Ceca S.A.), ingebracht. Op het poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu 11 g vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 verstoven. Hierna werd op het poeder, terwijl de impeller in bedrijf was, 47 g van de *Humicola lanuginosa* lipase met 3% (w/w) Kollidon K25 verstoven. Het gevormde granulaat werd tot gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10 % en de analyse van het monster kwam uit op 2,4 BAUN/g.

VOORBEELD 4

[0032] In een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd 50 g Clarcel CBL 3 ingebracht. Op het vloeibare poedervormige concentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd continu 72 g vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 met 5 % (w/w) gelatine (ASF gelatine, Sanofi Bio-Industries) verstoven. Het gevormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10 % en de analyse van het monster kwam uit op 5,1 BAUN/g.

VOORBEELD 5

[0033] In een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd 30 g Clarcel CBL 3 en 20 g talkpoeder ingebracht. Op het vloeibare poedervormige concentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd continu 20 g vloeibaar *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 verstoven. Hierna werd op het poeder, terwijl de impeller in bedrijf was, 28 g van het *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat met 2% (w/w) Methocel A-15 methylcellulose (Dow) verstoven. Het gevormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de analyse van het monster kwam uit op 7,7 BAUN/g.

VOORBEELD 6

[0034] Gedurende 30 minuten werd 250 g Celkate T-21 gewassen met 3 volumes 0,1 M acetaatbuffer, pH 4,5, gevolgd door filtreren onder vacuüm. Samen met 3 volumes 0,1 M acetaatbuffer, pH 4,5, werd in een hoeveelheid overeenkomend met 500.000 LU/g Celkate T-21 toegevoegd *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 en het geheel werd bij kamertemperatuur twee uur geroerd. Na filtreren onder vacuüm werd de geïmmobiliseerde lipase 24 uur bij kamertemperatuur gedroogd, werd het vochtgehalte gesteld op 10% en kwam de uitgevoerde analyse uit op 14,3 BAUN/g. Het filtraat bevatte 27565 kLU, overeenkomend met een adsorptie van 78% (of 390 kLU/g).

[0035] Van de zo gedroogde geïmmobiliseerde lipase op poedervormige Celkate T-21 werd 65 g ingebracht in een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1. Op het poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was, 55 g van een 5% (w/w) gelatine-oplossing verstoven. Hierna werd 0,1 g Aerosil 200 siliciumdioxide (Degussa) toegevoegd. Het gevormde granulaat werd bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de uitgevoerde analyse kwam uit op 5,9 BAUN/g.

20. VOORBEELD 7

[0036] Gedurende 30 minuten werd 200 g Clarcel CBL 3 gewassen met 3 volumes 0,1 M acetaatbuffer, pH 4,5, gevolgd door filtreren onder vacuüm. Samen met 3 volumes 0,1 M acetaatbuffer, pH 4,5, werd in een hoeveelheid overeenkomend met 500.000 LU/g Clarcel CBL 3 toegevoegd *Humicola lanuginosa* lipaseconcentraat zoals aangegeven in Voorbeeld 1 en het geheel werd bij kamertemperatuur twee uur geroerd. Na filtreren onder vacuüm werd de geïmmobiliseerde lipase tweemaal gewassen met 2 - 3 volumes 0,1 M acetaatbuffer, pH 4,5, en tweemaal met gedeïoniseerd water. De filtraaten bevatten 82761 kLU in totaal, overeenkomend met een adsorptie van 17% (of 86 kLU/g). De geïmmobiliseerde lipase werd 24 uur bij kamertemperatuur gedroogd en de uitgevoerde analyse kwam uit op 13,4 BAUN/g.

[0037] Van de zo gewassen geïmmobiliseerde lipase op poedervormig Clarcel CBL 3 werd 55 g ingebracht in een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1. Op

het poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu 61 g van een oplossing met 2% (w/w) gelatine en 1% Methocel A-15 methylcellulose (Dow) verstoven. Hierna werd 0,1 g Aerosil 200 siliciumdioxide (Degussa) toegevoegd. Het gevormde granulaat werd bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de uitgevoerde analyse kwam uit op 8,4 BAUN/g.

[0038] Van de zo gewassen geïmmobiliseerde lipase op poedervormig Clarcel CBL 3 werd nog een deel, d.w.z. 59 g, ingebracht in een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1. Op het poeder werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu 59 g van een oplossing met 5% (w/w) gelatine verstoven. Hierna werd 0,1 g Aerosil 200 siliciumdioxide (Degussa) toegevoegd. Het gevormde granulaat werd bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 700 µm). Het vochtgehalte werd gesteld op 10% en de uitgevoerde analyse kwam uit op 10,1 BAUN/g.

VOORBEELD 8

[0039] Dit is een productievoorbeeld zoals de voorbeelden 1 - 7, maar met een ander lipase voortbrengend micro-organisme.

[0040] Bereiding van monster 1: in 51 ml gedeïoniseerd water werden opgelost 12,9 g gevriesdroogde *Candida antarctica* B lipase in poedervorm met een activiteit van 250.000 LU/g en 1,4 g Kollidon K25. In een snelmenger zoals aangegeven in Voorbeeld 1 werd 50 g Celkate T-21 ingebracht en de hierboven aangegeven oplossing van *Candida antarctica* B lipase werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu op de poeder verstoven. Het gevormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 1000 µm).

[0041] Bereiding van monster 2: in 51 ml gedeïoniseerd water werden opgelost 12,9 g *Candida antarctica* B lipase en 0,86 g Methocel A-15. In een snelmenger werd 50 g Celkate T-21 ingebracht en de bovengenoemde oplossing werd, terwijl de impeller in bedrijf was, continu op de poeder verstoven. Het gevormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 1000 µm).

[0042] Bereiding van monster 3: in 48 ml gedeïoniseerd water werden opgelost 12,8 g *Candida antarctica* B lipase en 0,81 g Kollidon K25. In een snelmenger werd 50 g Celkate T-21 ingebracht en de bovengenoemde oplossing werd, terwijl de impeller in

bedrijf was, continu op de poeder verstoven. Het gevormde granulaat werd gedurende de nacht bij kamertemperatuur gedroogd en gezeefd (300 - 1000 μm).

VOORBEELD 9

[0043] Dit is een toepassingsvoorbeeld met het preparaat volgens Voorbeeld 8, in samenhang met Fig. 1.

[0044] De drie in Voorbeeld 8 beschreven monsters werden geëvalueerd in kolommen door een continue synthese van ethylglucoside-esters (EGE) door ethylglucoside (EG) te laten reageren met decaanzuur.

Reactie omstandigheden	
Afmetingen kolom	diameter = 1,5 cm; lengte = 20 cm
Grootte monster	5,0 g
Substraat	Ethylglucoside*) 4,98 kg
	Decaanzuur 4,92 kg
	Tertiair butanol 25% 3,30 kg
Temperatuur	60 °C
Vloei	30 g/h
Tijd	162 uur

*) Gesynthetiseerd door ethanol en D-glucose in aanwezigheid van een kationenwisselaar te laten reageren

[0045] Na 18, 44, 90 en 162 uur werden monsters genomen en met behulp van HPLC werden het gehalte aan EGE en EG gemeten en een berekening werd gemaakt van het omzettingspercentage. De resultaten worden weergegeven in Fig. 1. Bovendien werd opgemerkt dat de fysische stabiliteit van de monsters goed was.

Conclusies

1. Werkwijze voor het vervaardigen van een geïmmobiliseerd lipasepreparaat, omvattende

- a) het in een granulator of extruder inbrengen van een vloeibare lipasesamenstelling en een uit deeltjes bestaande silica- of silicaatdrager met een deeltjesgrootte van minder dan 100 μ m, en
- b) het uitvoeren van een granulering of extrusie voor het vormen van het geïmmobiliseerde lipasepreparaat.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk dat a) en b) worden uitgevoerd in één stap.

3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk dat a) en b) opeenvolgend worden uitgevoerd.

4. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 3, met het kenmerk dat de lipase is afgeleid van een stam van *Humicola*, *Candida antarctica* of *Rhizomucor miehei*.

5. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 4, met het kenmerk dat de silica of het silicaat een zuiverheid heeft van ten minste 50 %.

6. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 5, met het kenmerk dat het silicaat magnesiumsilicaat is.

7. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 6, met het kenmerk dat de granulator een fluid-bedsproeier-granulator, een snelmenger of een menger-granulator is.

8. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 7, met het kenmerk dat tijdens het granuleren of extruderen in de granulator of extruder een bindmiddel wordt toegevoegd.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk dat tijdens het granuleren of extruderen een vloeibare samenstelling van het bindmiddel door verstuiwen wordt ingebracht in de granulator of extruder.

10. Werkwijze volgens conclusie 8 of 9, met het kenmerk dat het bindmiddel gelatine of polyvinylpyrrolidon is.

11. Werkwijze volgens één der conclusies 1 - 10, met het kenmerk dat de vloeibare lipasesamenstelling tijdens het granuleren of extruderen door verstuiwen in de granulator of extruder wordt ingebracht.

=====

BEST AVAILABLE COPY

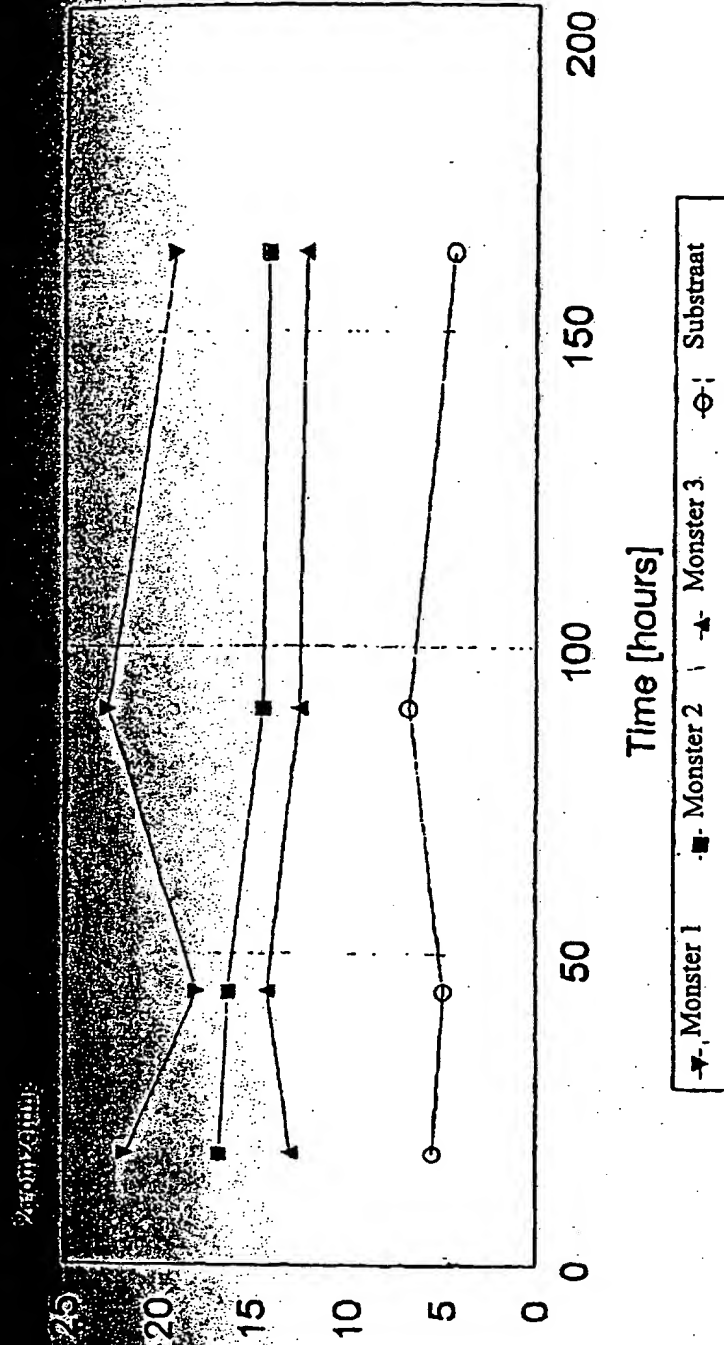


FIG. 1

BEST AVAILABLE COPY

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.